

应用蛋白质组学技术筛选胃癌 SGC-7901 细胞中的 let-7a 功能相关蛋白 *

朱益民¹⁾ 徐 其¹⁾ 董来荣¹⁾ 刘志明^{2) **}

(¹ 嘉兴市第二医院肿瘤外科, 嘉兴 314000; ² 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科, 南宁 530021)

摘要 为探讨 let-7a 表达下调在胃癌发病中的机制, 高通量地检测了与 let-7a 功能相关的蛋白质。首先采用基因克隆技术稳定过表达 SGC-7901 细胞系的 let-7a 基因, 然后用蛋白质组学技术研究稳定过表达该基因对 SGC-7901 细胞蛋白质表达谱的影响。通过对 SGC-7901/let-7a 细胞的蛋白质表达谱改变的研究, 并用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析鉴定了 10 个差异表达蛋白质。这些差异表达蛋白质可能是 let-7a 功能相关蛋白质, 其中抗氧化蛋白 2、胰岛素样生长因子结合蛋白 2、二硫化蛋白异构酶 A2、四氢叶酸合成酶、细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 1、Rho-GTPsae 激活蛋白 4 表达上调, Skp2 蛋白、血小板黏附蛋白 CD41、纤维连接蛋白、Cks1 蛋白表达下调。部分差异表达蛋白质如细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 1、Skp2 蛋白和纤维连接蛋白经蛋白质印迹分析进行了验证。在 SGC-7901/let-7a 中鉴定的 10 个差异表达蛋白质涉及到细胞周期的调控、分子基因表达调控、细胞黏附、细胞代谢等众多事件, 它们可能作为 let-7a 功能相关蛋白质, 为阐明 let-7a 表达下调在胃癌发病中的机制提供了重要线索。

关键词 miRNA, 胃癌, 蛋白质组学, 双向电泳, MALDI-TOF-MS

学科分类号 R57

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00513

微小 RNA(micro RNA, miRNA)普遍存在于多细胞生物中, 而且数量可观, 约占整个基因组基因总数 2% 左右^[1]。miRNA 在生物进化过程中高度保守, 它是一种内源性的、小的、非编码 RNA 分子, 长约 22 个核苷酸, 调控转录后的翻译^[2], 并已被证实参与和调控了包括时序发育、细胞凋亡、脂肪代谢、神经元发育、细胞分化、激素分泌等在内的多种生理过程^[3]。let-7a 是 1993 年后被发现的第二个 miRNA, 起初认为它参与基因表达的时序性调节, 随着数百个 miRNA 的相继被发现, 才认识到它兼有肿瘤抑制基因的功能。我们前期实验中发现胃癌中的 let-7a 表达量明显低于正常胃黏膜组织^[4], let-7a 在体内、外实验中均能抑制胃癌细胞的生长^[5]。蛋白质组学(proteomics)则是以蛋白质组为研究对象, 分析改变的蛋白质在各种疾病过程中发挥的作用, 解释各种病理生理过程演进的分子机理^[6]。从蛋白质整体水平上筛选胃癌细胞中 let-7a 功能相关的蛋白质分子, 为进一步研究 let-7a 在胃

癌中的作用机制提供了新的工具。本研究首先采用基因克隆技术稳定过表达胃癌细胞系 SGC-7901 的 let-7a 基因, 然后用蛋白质组学技术高通量地分离、鉴定 let-7a 过表达的 SGC-7901/let-7a 细胞, 与转染空白载体的对照胃癌细胞株细胞 SGC-7901/EV, 及亲代 SGC-7901 细胞中差异表达的蛋白质, 并对部分差异表达蛋白质的表达水平进行了验证, 以寻找与 let-7a 基因功能相关的蛋白质, 为阐明 let-7a 抑制胃癌的机制提供可能的线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及质粒来源 人胚胎肾上皮细胞 293 T、人胃癌细胞系 SGC-7901 均购自中国科学院上海细

* 广西壮族自治区科技攻关项目(桂科攻 10124001A-49)。

** 通讯联系人。

Tel: 0771-5356738, E-mail: zym330422@163.com

收稿日期: 2010-10-03, 接受日期: 2011-01-17

胞库；质粒 Pwpxl-MOD2、pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 购自 Invitrogen 公司；let-7a 表达质粒 Pwpxl-MOD2-let-7a 由广西医科大学实验中心构建。
1.1.2 引物及主要试剂来源. let-7a 特异性寡核苷酸引物由 Invitrogen 公司设计合成，上游引物序列 AGGATCCAAAGGTGGTGGTAAGAGGGTGAT，下游引物序列 AGTCGACATAAGACAAGAACAAAAGGTTT；胎牛血清、RPMI1640 培养液购于美国 Gibco 公司；总 RNA 提取试剂 Trizol 购于 Invitrogen 公司；逆转录试剂盒购于 Promega 公司；限制性内切酶、Real-time PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司；T4 连接酶购自 TOYOBO 公司；DNA 抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司；丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、超纯尿素、CHAPS、IPG 缓冲液(pH 4~7)、24 cm 固相化 pH 4~7 梯度干胶条和覆盖液购自 Amersham Pharmacia 公司；二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、TPCK 处理的胰蛋白酶、铁氰化钾、三氟乙酸(TFA)、碳酸氢铵、硫代硫酸钠、乙腈和 CCA 购自 Sigma 公司；兔抗人 GAPDH 购自 Sigma 公司；细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 1(cyclin-dependent kinase inhibitor 1, CDKN1)兔抗人抗体(AP7527b)购自 ABGENT 公司；S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2)兔抗人抗体(ab19877) 和纤维连接蛋白(fibronectin)兔抗人抗体(ab23750)、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体购自 Abcam 公司；SYBRGreen I 混合染料购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 仪器. 实时定量 PCR(qReal time-PCR)仪为 Eppendorf Real Plex4, Eppendorf Co LTD 产品。IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT 垂直电泳槽、Imagescanner 扫描仪系 AmershamBiosciences 公司产品；Applied Biosystem Voyager-DE STR Biospectrometry™ Workstation System 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪系 ABI 公司产品；LightCycler System 荧光 PCR 仪系德国 Roche 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组慢病毒介导的基因转移. 用磷酸钙沉淀法将 Pwpxl-MOD2-let-7a、pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 共转染包装细胞 293 T，获得携带目的基因 let-7a 和绿色荧光蛋白(GFP)基因的重组病毒，同时共转染 Pwpxl-MOD2、pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 进另一组 293 T 作为空载体。按文献[7]方法

获取重组慢病毒后用它们分别感染胃癌 SGC-7901 细胞系，分别获得表达 let-7a 的 SGC-7901/let-7a 细胞株(实验组)和转染了空载体的 SGC-7901/EV 细胞株(阴性对照组)，亲代 SGC-7901 细胞作为本实验的空白对照组。

1.2.2 胃癌细胞株 let-7a 基因表达检测.

a. 重组慢病毒介导基因转导效率的检测. 重组病毒感染 48 h 后，将培养皿放在荧光显微镜下，观察有绿色荧光的细胞数，判断感染的效率。同时可用流式细胞仪(FCM)检测 GFP 阳性细胞百分数，验证慢病毒感染效率(转基因效率)。

b. 采用 qReal time-PCR 检测三组细胞中目的基因的表达. 重组病毒感染细胞 72 h 后收集靶细胞，按 TrIzol Reagent 说明书的步骤，抽提各组细胞的 Total RNA，并利用 ReverTra Ace-α First Strand cDNA Synthesis Kit，经 RT-PCR 生成相应的 cDNA，逆转录引物 let-7aPRT: GTCGTATCCA-GTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACG-ACAACTA，经 RT-PCR 生成相应的 cDNA，以各组 cDNA 作为模板，利用两步法进行 qReal time-PCR. 采用 20 μl 反应体系，SYBR Green 荧光染料 10 μl, 10 μmol/L 的引物 1 μl, cDNA 5 μl, H₂O 4 μl. 反应条件：退火温度为 54°C，延伸温度为 45°C，共 40 个循环，读取 Ct(Cycle threshold)值。据相对定量法(mRNA 的相对变化量公式 Ratio=2^{-ΔΔCt})计算目标片段的扩增比例。各样本重复 3 次，以 18S RNA 作为内参。空白对照组以同样的方法作检测。

1.2.3 双向凝胶电泳. 用细胞刮收集对数生长期的 SGC-7901/let-7a、SGC-7901/EV 和 SGC-7901 细胞，加入细胞裂解液(7 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，100 mmol/L DTT, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 2% Pharmalyte, 1 g/L DNase I)裂解 2 h，低温离心机 12 000 r/min 离心 45 min 后取上清用蛋白质定量试剂盒 2D Quantification kit (AmershamBiosciences) 测定蛋白质浓度，其余分装于 -80°C 冻存备用。细胞总蛋白 1.2 mg 与水化液(8 mol/L 尿素，4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG 缓冲液 pH 4~7, 痕量溴酚蓝)混合，上样总体积 450 μl. 30 V 水化 14 h 后经 500 V 1 h、1 000 V 1 h、8 000 V 8.5 h 进行等电聚焦。等电聚焦后分别于 10 ml 平衡 A 液(6 mmol/L 尿素，2% SDS, 30% 甘油，50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 0.2% DTT,

痕量溴酚蓝) 和 10 ml 平衡 B 液 (6 mmol/L 尿素, 2% SDS, 30% 甘油, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 3% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝) 各平衡 15 min。平衡后的 IPG 胶条转移至 12% 0.75 mm SDS-PAGE 胶上端进行第二向垂直电泳。

1.2.4 图像分析. 应用 Imagescanner 扫描仪对银染的双向电泳胶扫描。对 SGC-7901/let-7a、SGC-7901/EV 和 SGC-7901 每株细胞的 3 张双向电泳图, 使用 PDQuest 2-DE 软件进行匹配成组, 组间比较并选取 5 倍以上变化的蛋白质点为实验组与对照组差异表达的蛋白质。

1.2.5 差异蛋白质点 MALDI-TOF-MS 分析. 切割蛋白质点于 1.5 ml EP 管中, 50% 乙腈和 50 mmol 碳酸氢铵脱色 30 min, 乙腈脱水冷冻抽干。加入 10 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶(0.1 mg/L)冰上吸胀 40 min, 37°C 酶解 12 h, 30 μ l 萃取液(100% 乙腈与 5% 三氟乙酸 1:1)萃取 60 min, 重复 2 次。将萃取液收集于 0.5 ml EP 管冷冻浓缩至约 10 μ l, 取 0.5 μ l 样品与 1 μ l 基质液 CCA 混合, 点样于不锈钢板。MALDI-TOF-MS 质谱仪采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压 20 000 V, 反射电压比 1.12, N₂ 激光波长 337 nm, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度 4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 质谱使用胰蛋白酶自降解峰 m/z 842.50 和 m/z 2211.10 作为内校正, 获得肽质量指纹图谱。Mascot 软件检索 Swiss Prot 数据库鉴定差异表达蛋白质。

1.2.6 蛋白质印迹验证差异蛋白质点表达水平. 收集对数生长期的 SGC-7901/let-7a、SGC-7901EV 和 SGC-7901 细胞, PBS 充分清洗后加入预冷的细胞裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 2.5 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L PMSF, 2.5 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, 5 mg/L of aprotinin, pepstatin A 和 leupeptin 1) 冰上裂解 40 min, 4°C 12 000 g 离心 15 min, 取上清即为细胞总蛋白。Bradford 方法测定蛋白质浓度后, 将上清 500 μ g 总蛋白进行 12.5% SDS-PAGE 分离, 蛋白质转移至硝酸纤维膜上, 印迹膜 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 1:1 000 稀释的兔抗人 CDKN1、Skp2 和 Fibronectin 抗体 4°C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min. 1:2 000 稀释的羊抗兔二抗室温温育 1 h, PBS 洗涤 3 次,

ECL 试剂发光及显影, 以 GAPDH 为内参照, 实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件对样本均数作单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 有意义。

2 结 果

2.1 基因转导效率的检测结果

重组慢病毒感染靶细胞 48 h 后, 将培养皿放在荧光显微镜下, 可以看到近全部细胞表达 GFP, 见图 1. 流式细胞仪检测靶细胞 GFP 表达, 其阳性率达 98% 以上。

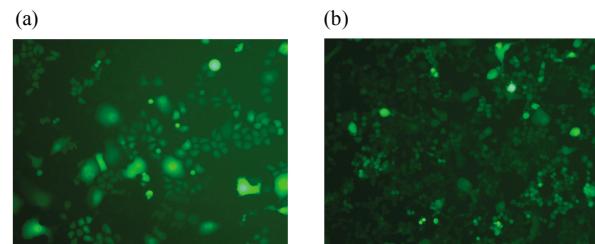


Fig. 1 SGC-7901 cells transduced with lentiviral vectors
(a) Selected cells (parental SGC-7901) were transduced with let-7a lentiviral vectors at a multiplicity of infection of 5 and selected for stable integrants using EGFP reporter gene. Original magnification: $\times 200$. (b) Selected cells (parental SGC-7901) were transduced with empty lentiviral vectors at a multiplicity of infection of 5 and selected for stable integrants using EGFP reporter gene. Original magnification: $\times 200$.

2.2 采用 qReal time-PCR 检测三组细胞中 let-7a 的表达结果

将实验组、空载体组、空白对照组细胞采用 qReal time-PCR 检测后, 读取各组的 Ct 值, $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{实验组 let-7a}) - Ct(\text{实验组 18S RNA})] - [Ct(\text{空白对照组 let-7a}) - Ct(\text{空白对照组 18S RNA})]$, 然后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算, 表示实验组 let-7a 基因的表达与空白对照组的相对变化倍数, 同法计算空载体组 let-7a 基因的表达与空白对照组的相对变化倍数。重组慢病毒介导的 Pwpxl-MOD2-let-7a 转导入胃癌 SGC-7901 细胞后, let-7a 的表达量高达亲代 SGC-7901 的 9 倍, 而阴性对照组(重组慢病毒介导的 Pwpxl-MOD2 转导入胃癌 SGC-7901 细胞)和亲代 SGC-7901 细胞检测到的 let-7a 的表达水平相当, 见图 2、图 3。

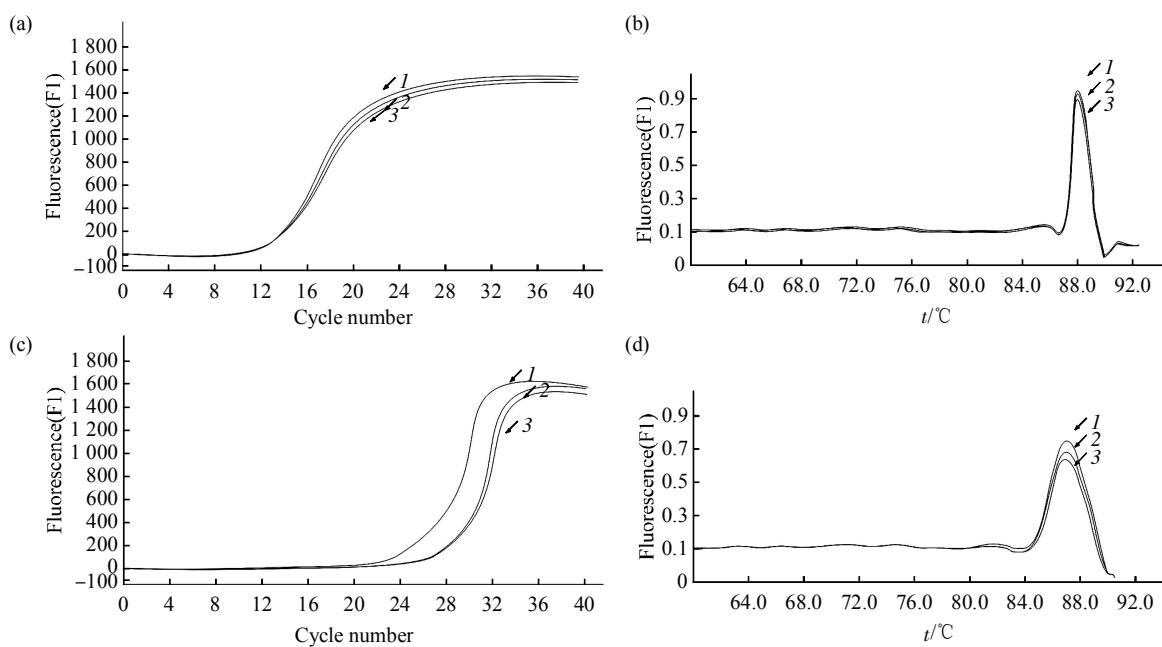


Fig. 2 Representative real-time quantitative RT-PCR analysis for of let-7a level

The expression level of let-7a was examined and was normalized to that of 18S RNA. (a) Graph showed that 18S RNA among SGC-7901/let-7a, SGC-7901/EV and SGC-7901 cell lines had very little difference. (c) Graph showed that let-7a significantly increased in the SGC-7901/let-7a cell line. (b) and (c) Graph showed the melt curve of representative PCR products of 18S RNA and let-7a respectively. 1: SGC-7901/let-7a; 2: SGC-7901/EV; 3: SGC-7901.

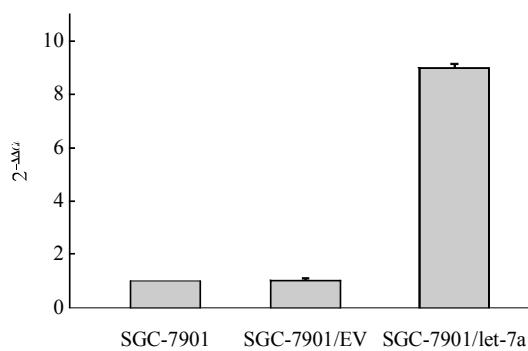


Fig. 3 Relative expression levels of let-7a

2.3 双向凝胶电泳图谱的建立

建立了分辨率较高、重复性较好的细胞蛋白质双向凝胶电泳图谱，软件分析 SGC-7901、SGC-7901/EV 和 SGC-7901/let-7a 细胞双向电泳图，结

果显示：SGC-7901、SGC-7901/EV 和 SGC-7901/let-7a 组的蛋白质点数分别为 1043、1046、1026，获得的大部分蛋白质表达模式是相同的。其中 SGC-7901、SGC-7901/EV 两张胶中蛋白质基本相同。在 SGC-7901/EV 和 SGC-7901/let-7a 组胶中，可以在预期等电点和分子质量大小处找到 GFP 蛋白，并经质谱验证。SGC-7901/let-7a 组与其他两个组相比，有较多不同，差异点 79 个：其中 11 个蛋白质点仅在 SGC-7901/let-7a 组中表达，31 个蛋白质点在 SGC-7901/let-7a 组中表达上调，21 个蛋白质点在 SGC-7901/let-7a 组中表达缺失，16 个蛋白质点在 SGC-7901/let-7a 组中为表达下调。其典型的 SGC-7901、SGC-7901/EV 和 SGC-7901/let-7a 细胞双向电泳图见图 4，其中标注的 10 个点表达量差异达 5 倍以上。

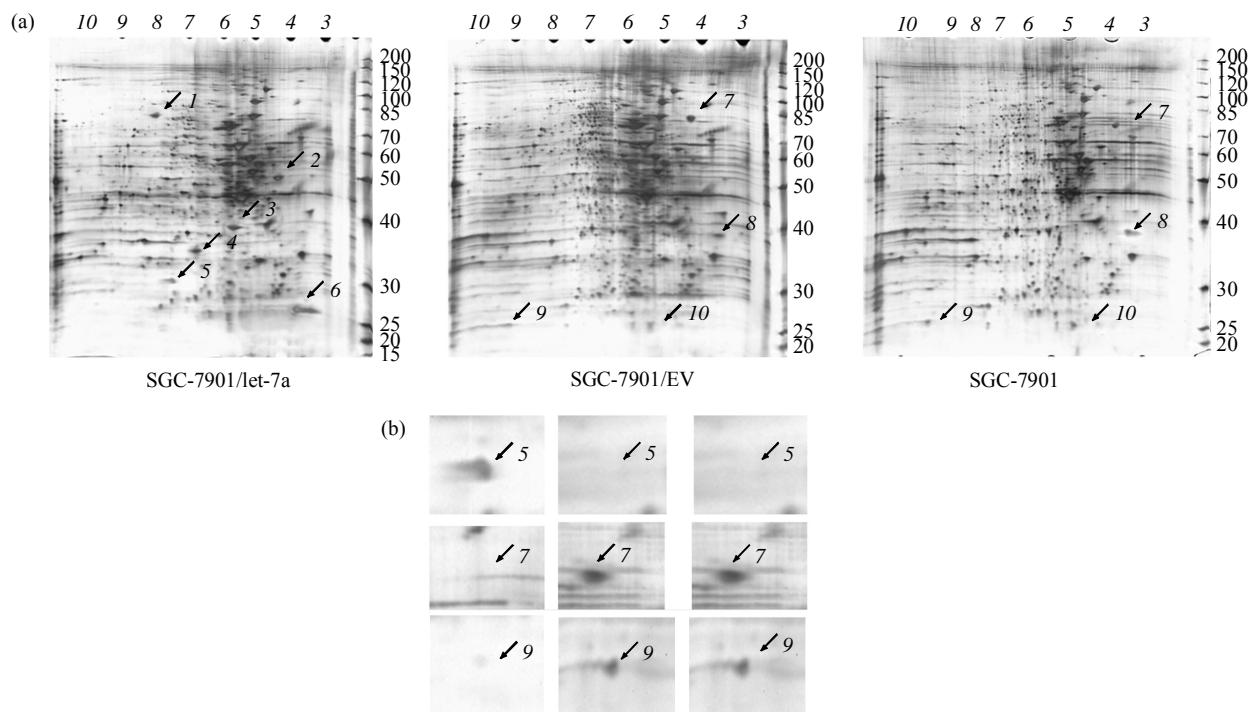


Fig. 4 Representative 2-DE maps of SGC-7901, SGC-7901/EV and SGC-7901/let-7a cell lines

(a) 10 differential expression proteins spots marked with arrows were identified using 2-DE. (b) Close-up image of partial differential expression protein spots among SGC-7901/let-7a, SGC-7901/EV and SGC-7901 cells.

2.4 差异蛋白质点的质谱鉴定

随机选择 6 个在 SGC-7901/let-7a 细胞中高表达的蛋白质点和 4 个 SGC-7901/let-7a 细胞中缺失的点打质谱, 进一步分析。经 MALDI-TOF 肽质量指纹图谱分析, 获得的蛋白质点的肽质量指纹图谱 (PMF), 其中 5、7、9 号蛋白质点的肽指纹图谱见

图 5. 用 Mascot Distiller 软件识别单同位素信号峰, 获得的肽片段的质荷比(m/z)数值输入 Mascot 查询系统, 检索 Swiss-prot 和 NCBI 蛋白质数据库, 10 个差异表达的蛋白质点全部得到鉴定, 结果描述见表 1。

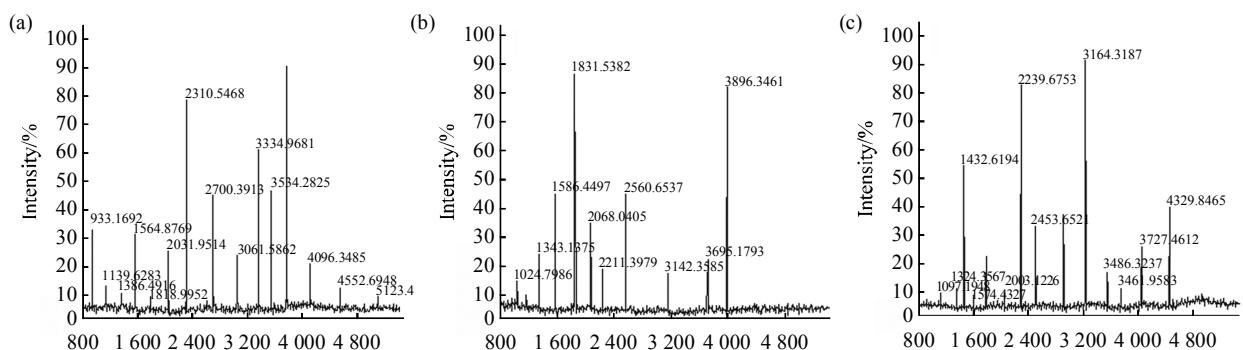


Fig. 5 MALDI-TOF-MS analysis of differential proteins

(a) MALDI-TOF-MS mass spectrum of spot 5 identified as CDKN1 according to the matched peaks was shown. (b) MALDI-TOF-MS mass spectrum of spot 7 identified as Skp2 according to the matched peaks was shown. (c) MALDI-TOF-MS mass spectrum of spot 9 identified as Fibronectin according to the matched peaks was shown.

Table 1 MALDI-TOF-MS identified proteins in SGC-7901/let-7a vs. SGC-7901 and SGC-7901/EV

Spot No.	Protein name	Accession number	Matching	pI	Molecular mass	%Coverage
1	Antioxidant protein 2	P30041	7/19	8.28	82 904	40.9%
2	Insulin-like growth factor binding protein 2	P18065	7/13	4.31	50 137	42.1%
3	Protein disulfide isomerase A2	Q13087	6/18	6.04	39 206	51.5%
4	C-1-tetrahydrofolate synthase	P11586	7/23	6.79	34 428	65.6%
5	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	P38936	4/13	7.24	31 119	38.3%
6	Rho-GTPase activating protein 4	P98171	9/22	3.73	27 055	55.5%
7	S-phase kinase-associated protein 2	Q13309	7/11	3.97	77 439	32.5%
8	Platelet membrane glycoprotein	P08514	5/12	3.62	38 107	47.1%
9	Fibronectin	P02751	8/15	9.61	25 933	52.6%
10	Cks1 protein	P61024	4/11	5.13	26 214	61.9%

Differentially labelled proteins from 2D analysis were identified by MALDI-TOF peptide mass fingerprinting. The Swiss-Prot accession number, peptides matching, pI, molecular mass and %coverage of analysed peptides are shown for each protein. Proteins displaying an average fold-difference of ≥ 5 fold up (+) or down (-) regulation between pairs of conditions were considered as significant difference.

2.5 差异蛋白质点的 Western-blot 验证

SGC-7901/let-7a 组与 SGC-7901 组、SGC-7901/EV 组相比, CDKN1、Skp2 表达上调, 纤维连接蛋白表达下调。与蛋白质组学分析结果一致。图 6 示 Western-blot 分析结果。

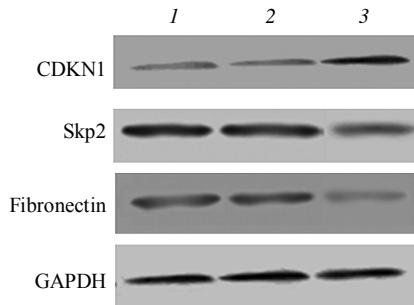


Fig. 6 Representative Western blot analysis of CDKN1, Skp2 and fibronectin using GAPDH as internal control among SGC-7901, SGC-7901/EV and SGC-7901/let-7a cell lines

Compared with SGC-7901/EV and SGC-7901, SGC-7901/let-7a had obvious up-regulation of CDKN1, and a marked down-regulations of Skp2 and fibronectin. 1: SGC-7901/let-7a; 2: SGC-7901/EV; 3: SGC-7901.

3 讨 论

蛋白质组学从整体的角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分, 了解蛋白质之间的相互作用和

相互联系, 揭示蛋白质功能和细胞生命活动规律^[8]。应用蛋白质组学的技术筛选 let-7a 功能相关的蛋白质有着重要的价值, 它是一种新的尝试。本研究成功地鉴定出 10 种 let-7a 功能相关的蛋白质。SGC-7901/let-7a 细胞组与 SGC-7901、SGC-7901/EV 细胞组相比: 抗氧化蛋白 2、胰岛素样生长因子结合蛋白 2、二硫化蛋白异构酶 A2、四氢叶酸合成酶、细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 1、Rho-GTPase 激活蛋白 4 表达上调; Skp2 蛋白、血小板黏附蛋白 CD41、纤维连接蛋白、Cks1 蛋白表达下调。细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 1 即 p21 是 p53 下游的一个重要的靶基因, 参与细胞周期的负调控过程, 主要与 G1 → S 期转换有关, 可抑制细胞增殖和细胞凋亡^[9]。Skp2 是 1995 年 Zhang 等^[10]最初发现的细胞周期中 S 期激酶相关蛋白。有研究揭示了 Skp2 参与肿瘤细胞 G2/M 周期检查点调控的分子机制^[11]。纤维连接蛋白是细胞外基质的主要成分, 参与细胞分化、迁移以及肿瘤浸润等过程^[12]。Cyclin kinase subunit 1 (Cks1) 是高度保守的细胞周期调节蛋白 Suc1/Cks 家族成员之一。已有研究发现从正常胃黏膜组织、胃不典型增生组织到胃癌组织, Cks1 蛋白表达呈上升趋势。胃癌中 Cks1 的表达与肿瘤分化程度相关, 这说明 Cks1 可能参与了胃癌的发生^[13]。血小板黏附蛋白(platelet membrane glycoprotein)是指形成血小板内皮黏附基础的蛋白质。恶性肿瘤患者凝血功能处于很不稳定的状态, 肿瘤细胞可通过多种机制激活血小板, 而

血小板活化与肿瘤的生长、转移、扩散及血栓形成相关^[14]。Rho GTPases 是一组分子质量约 20~25 ku 的鸟苷酸结合蛋白, 属小 G 蛋白家族。目前研究发现, Rho 蛋白与肿瘤发生、侵袭与转移、细胞周期调控及凋亡均有密切的关系^[15]。胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (insulin-like growth factor binding protein 2) 抑制或刺激胰岛素样生长因子的促进细胞生长效应, 与细胞增殖相关^[16]。抗氧化蛋白 2 (antioxidant protein 2) 能调节细胞内的氧化还原反应, 保护磷脂避免其被氧化损伤, 并能降解某些化学致癌物^[17]。二硫化蛋白异构酶 A2 (protein disulfide isomerase A2) 能催化多肽链内和多肽链之间二硫键的形成, 与蛋白质的折叠密切相关^[18]。四氢叶酸合成酶(C-1-tetrahydrofolate synthase)参与叶酸代谢, 它们在胃癌癌变机制中的意义尚不清楚, 有待日后进一步研究。综上所述, 人胃癌细胞 SGC-7901 过表达 let-7a 后蛋白质表达谱发生变化, 上调和(或)下调相关蛋白质的表达。这些蛋白质根据 Swiss-Prot 和 NCBI 数据库中提供的功能注释, 可将它们初步分为以下 4 类: 信号传导相关蛋白质、与转录和翻译相关蛋白质、代谢相关蛋白质、细胞结构相关蛋白质。这些资料揭示了胃癌病变中可能存在的 let-7a 相关信号通路, 经相应信号传导途径, 导致 SGC-7901 细胞的生物学行为发生变化。这一结果为探讨 let-7a 对胃癌细胞影响的机制提供了重要依据和线索。这些蛋白质与 let-7a 的关系值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Berezikov E, Guryev V, Vande Belt J, et al. Hylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 2005, **120**(1): 21–24
- [2] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, **294**(10): 853–858
- [3] Brennecke J, Hipfner D R, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 2003, **113**(4): 25–36
- [4] Zhu Y M, Zhong Z X, Liu Z M. Significance and relationship between let-7a and gastric mucosa cancerization. *World J Gastroenterology*, 2010, **16**(26): 3325–3329
- [5] 朱益民, 刘志明, 白卫兵, 等. let-7a 对人胃癌细胞凋亡影响的体外实验研究. *中华实验外科杂志*, 2010, **16**(26): 424
- Zhu Y M, Liu Z M, Bai W B, et al. Chin J Experiment Surgery, 2010, **16**(26): 424
- [6] Mullner S, Neumann T, Lottspeich F. Proteomics—a new way for drug target discovery. *Arzneimittelforschung*, 1998, **48**(1): 93–95
- [7] Hanawa H, Kelly P F, Nathwani A C, et al. Comparison of various envelope proteins for their ability to pseudotype lentiviral vectors and transduce primitive hematopoietic cells from human blood. *Mol Ther*, 2002, **5**(3): 242–251
- [8] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, **13**(1): 19–50
- [9] Noda A, Ning Y, Venable S F. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*, 1994, **211**(1): 90–98
- [10] Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, et al. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin ACDK2 S phase kinase. *Cell*, 1995, **82**(6): 915–925
- [11] DeSalle L M, Pagano M. Regulation of G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett*, 2001, **490**(3): 179–189
- [12] Yi M, Ruoslahti E. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(2): 6202–6241
- [13] Sitry D, Seeliger M A, Ko K, et al. Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *J Biol Chem*, 2002, **277**(44): 42233–42240
- [14] Joseph J E, Harrison P, Mackie I J, et al. Platelet activation markers and the primary antiphospholipid syndrome (PAPS). *Lupus*, 1998, **7**(S2): s48
- [15] Ridley A J. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, 2001, **114**(15): 2713–2722
- [16] Zha H, Raffeld M, Charboneau L. Similarities of prosurvival signals in Bcl-2-positive and Bcl-2-negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray. *Lab Invest*, 2004, **84**(2): 235–244
- [17] Phelan S A. AOP2 (antioxidant protein 2): structure and function of a unique thiol-specific antioxidant. *Antioxid Redox Signal*, 1999, **1**(4): 571–584
- [18] Desilva M G, Lu J, Donadel G. Characterization and chromosomal localization of a new protein disulfide isomerase, PDIP, highly expressed in human pancreas. *DNA Cell Biol*, 2004, **15**(1): 9–16

Identification of Proteins Associated With let-7a in Gastric Carcinoma Cell Line SGC-7901 by Proteomics*

ZHU Yi-Min¹⁾, XU Qi¹⁾, DONG Lai-Rong¹⁾, LIU Zhi-Ming^{2)**}

(¹) Department of Oncology, The Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, China;

(²) Gastrointestine and Gland Surgery Division, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract In order to elucidate the mechanisms of let-7a down-regulation in pathogenesis of gastric carcinoma, proteins associated with the function of let-7a were detected in high throughout screening. The cell line of SGC-7901 stably overexpressing let-7a was successfully established by gene clone. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used to separate the total proteins of SGC-7901/let-7a, SGC-7901/EV and SGC-7901, and PDQuest software was applied to analyze 2-DE images. Ten differential protein spots were identified by MALDI-TOF-MS, and they may be the proteins associated with let-7a function. The overexpressed proteins included antioxidant protein 2, insulin-like growth factor binding protein 2, protein disulfide isomerase A2, C-1-tetrahydrofolate synthase, cyclin-dependent kinase inhibitor1 and Rho-GTPase activating protein 4. The underexpressed proteins were consisted of S-phase kinase-associated protein 2, platelet membrane glycoprotein, fibronectin and Cks1 protein. Furthermore, the differential expression levels of the partial proteins (CDKN1, Spk2 and fibronectin) were confirmed by Western blot analysis. The 10 differentially expressed proteins could be divided into groups based on their functions: signal transduction, chaperone, transcription and translation, metabolism and cytoskeleton, which were involved in cell cycle, the transcription regulation, cell adherence, cellular metabolism and so on. The data suggest that these differential proteins may be associated with the function of let-7a in gastric carcinoma, and will be valuable for further to study the mechanisms of let-7a down-regulation in pathogenesis of gastric carcinoma.

Key words miRNA, gastric carcinoma, proteomics analysis, two-dimensional gel electrophoresis, MALDI-TOF-MS

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00513

*This work was supported by a grant from The Key Science and Technology Projects of Guangxi Zhuang Autonomous Region China (10124001A-49).

**Corresponding author.

Tel: 86-771-5356738, E-mail: zym330422@163.com

Received: October 3, 2010 Accepted: January 17, 2011